中国生态农业学报 2016 年 3 月 第 24 卷 第 3 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Mar. 2016, 24(3): 356−364

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.150967

外源抗坏血酸与谷胱甘肽对打顶后烟草氧化还原平衡及烟碱的影响*

罗映虹 张一扬 刘晓颖 李 爽 刘 坤 崔超岗 谭观萍 周冀衡**

(湖南农业大学烟草研究院 长沙 410128)

摘 要 烟碱含量偏高是我国烤烟的现状。如何有效降低烟叶烟碱含量，提高烤烟工业可用性是烟叶生产中的一个难题。根据烟草打顶导致烟碱含量急剧上升和机械损伤造成细胞氧化迸发的的现象，本试验从打顶创伤引起的一系列生理变化入手，采取打顶后在伤口涂抹抗氧化剂抗坏血酸+谷胱甘肽(AsA+GSH)和抗坏血酸(AsA)两种方法来抑制活性氧含量的上升，探究茉莉酸刺激烟碱含量上升和活性氧含量之间的关系，并比较两种方法在抑制活性氧及烟碱上升的效果。结果发现，涂抹 AsA+GSH 和 AsA 处理对烟草叶片超氧阴离子、过氧化氢、丙二醛的上升有抑制效果，过氧化氢降解速度慢于超氧阴离子，在烟草内有积累现象。涂抹 AsA+GSH 和 AsA 处理在打顶 6 h 时茉莉酸含量低于常规打顶，对茉莉酸的产生有抑制效果。其中处理 96 h 后，打顶后涂抹 AsA+GSH 的处理叶片烟碱含量比常规打顶低 21.5%，打顶后涂抹 AsA 的处理叶片烟碱含量比常规打顶低 17.5%。且各检测指标之间存在显著或极显著的相关性。另外，打顶后 24 h，各处理的活性氧含量回到对照(不打顶)的水平。试验表明，抗氧化型物质(AsA+GSH)涂抹打顶后烟草的伤口能有效抑制活性氧、茉莉酸和烟碱含量的上升，且活性氧、茉莉酸、烟碱之间存在着密切联系。AsA+GSH 比 AsA 有更强的抗氧化性，能更好地抑制打顶后烟碱的上升。

关键词 抗坏血酸 谷胱甘肽 烟草打顶 活性氧 茉莉酸 烟碱
中图分类号: S572; Q599 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2016)03-0356-09

Influence of daub exogenous ascorbic acid and glutathione on wounds after tobacco topping on redox equilibrium and nicotine content of tobacco*

LUO Yinghong, ZHANG Yiyang, LIU Xiaoying, LI Shuang, LIU Kun, CUI Chaogang, TAN Guanping, ZHOU Jiheng**

(Institute of Tobacco Research, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract Nicotine is not only an important chemical component of tobacco leaves, but also one of the important quality indexes of cigarette. The current state of flue-cured tobacco in China with nicotine on the high end has severely influenced China-produced tobacco leaf quality. Effectively reducing nicotine content of tobacco leaves and improving flue-cured tobacco usability has been a difficult issue in the tobacco production industry. The content of nicotine in tobacco doubled and redoubled after topping. Because of the sharp rise in nicotine content after tobacco topping and cells oxidative burst due to mechanical damage, testing started with a series of physiological changes induced by topping in this study. The two methods used in the test included daub of both ascorbic acid and glutathione (AsA+GSH), and daub of ascorbic acid (AsA). Other three methods were also applied in the experiment, duab of buffer solvent after topping, conventional topping and not topping. These methods were applied to tobacco wounds after topping to suppress the rise in active oxygen content, explore the relationship

* 云南省烟草公司生产研究与应用计划[云烟科(2014)302 号, 2014YN24]资助
** 通讯作者: 周冀衡, 主要从事烟草生理生化及品质研究工作。E-mail: jhzhou2005@163.com
罗映虹, 主要从事烟草生理生化及品质研究工作。E-mail: yclyh2588@gmail.com
收稿日期: 2015−09−06 接受日期: 2015−12−08

* Supported by the Project of Yunnan Tobacco Companies [Yunnan Tobacco Sci. 302 (2014), No. 2014YN24]
** Corresponding author, E-mail: jhzhou2005@163.com
Received Sep. 6, 2015; accepted Dec. 8, 2015

between active oxygen content and jasmonic acid-stimulating nicotine content growth, and to compare the effects of the two methods on suppressing the rise in active oxygen and nicotine content. The results showed that the rise in the contents of super oxygen anion, hydrogen peroxide and malondialdehyde of tobacco leaves dropped when daubing AsA+GSH and AsA to the topping wounds. Hydrogen peroxide degradation was slower than that of oxygen anion, which accumulated in tobacco. Jasmonic acid content under daub of AsA+GSH or AsA treatments was lower than that under conventional topping treatment at 6 h after treatment and with adverse effect on jasmonic acid. At 96 h after treatment, nicotine content of leaves under AsA+GSH treatment was 21.5% lower than that under conventional topping treatment. The content of nicotine in tobacco leaves under AsA treatment was 17.5% lower than that under conventional topping treatment. Correlation analysis among response intensity of each detection index to topping showed significant or extremely significant correlation between the detection indexes. Also at 24 h after topping, active oxygen content of each treatment dropped back to the non-topped level (not topping treatment). The test showed that daubing antioxidant substances (AsA+GSH) to tobacco wounds after topping effectively suppressed reactive oxygen species, jasmonic acid and nicotine contents rise. There was also a close relationship between reactive oxygen species, jasmonic acid and nicotine. AsA+GSH treatment was better than AsA treatment in antioxidant activity, and was therefore better in suppressing nicotine content rise in tobacco leaves after topping.
Keywords　Ascorbic acid; Glutathione; Tobacco topping; Reactive oxygen species; Jasmonic acid; Nicotine

植物创伤后，内源激发子(endogenous elicitor)会激活体内茉莉酸、水杨酸和乙烯等多种信号转导途径，最终产生防御反应[1]，但是激发子与各种信号转导途径的路径却研究较少。烟碱是烟草体内广泛存在的一类次生代谢产物，一般呈碱性。烟碱不仅是烟叶中的重要化学成分，也是卷烟中的重要品质指标之一，在烟气中若烟碱含量过低则劲头小，吸味平淡；若烟碱含量过高则劲头大，刺激性增强，产生辛辣味。近几年，随着优质烟叶生产技术的普及与推广，我国部分烟区烟叶外观质量接近国际水平，但烤烟烟碱平均含量却达 3%~4%，而正常情况下烤烟烟碱平均含量应低于 3%[2]。因此，研究控制烟叶烟碱含量在合理范围，是保证烤烟高质量的重要手段。

打顶是烟草栽培的一项农艺措施，同时对烟草也是一种伤害。试验证明，人为造成的机械损伤能全部或部分地模拟昆虫取食，可以造成直接防御反应系统的启动[3]。机械损伤后，植物细胞为避免遭受更大伤害，进行过敏反应，伤口周围的细胞可发生程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD)[4]，这种程序化死亡中最明显的化学反应是“氧化迸发”(oxidative burst)。氧化迸发能打破原有的氧化还原的平衡[5]。一般情况下，活性氧(reactive oxygen species, ROS)能在自身产生的酶类超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的共同作用下分解，稍过多的 ROS 也可以通过植物体内合成的非酶类，类黄酮、抗坏血酸、谷胱甘肽、α-生育酚、类胡萝卜素等非酶类化合物淬灭[6−10]，但在氧化迸发时，植物体内 ROS 大量增加，过多的 ROS 已经超出了体内抗氧化物的清除能力极限，多余的 ROS 几乎能够与所有的生物大分子包括蛋白、脂类、多糖和核酸发生反应[11]。ROS 还可以促进植物激素的合成，产生一系列抗性反应：ROS 可以攻击质膜上的亚麻酸、亚油酸和花生四烯酸，导致它们过氧化反应，而 Vick 等[12]在 20 世纪 80 年代研究合成茉莉酸的十八烷途径中提到茉莉酸前体物来自叶绿体膜上的亚麻酸过氧化反应，说明 ROS 可能是诱导茉莉酸产生的原因，茉莉酸是一种植物激素，可以诱导烟草抗性反应产生烟碱[13]，这些说明打顶、ROS、茉莉酸、烟碱之间可能存在一些因果关系。当然，烟碱的合成并不一定只受茉莉酸的调控，可能是一系列物质的综合调控。许多研究表明 ROS 可以诱导水杨酸、乙烯、植保素的合成[14−20]，它们都可以调节植物的抗逆性反应；各种调节之间也可能相互协同配合，如茉莉酸可以和 ROS 共同调节乙烯合成过程中的 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC 合酶)活性[21]；另外，H_2O_2 作为一种相对稳定的 ROS，本身也是一种调节剂[10,22]。

对于烟草打顶后烟碱含量迅速上升的问题，程新胜等[23]、宗娜等[24]和黄兰等[25]从一些食烟草的寡食性昆虫得到启发，将此类昆虫下唇腺分泌的特异性酶所研制的仿生信号分子(BSM)涂抹于打顶后的伤口，发现能抑制茉莉酸、脂氧合酶(LOX)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)含量的上升，并最终抑制烟碱含量的上升；张新华等[26]、李影等[27]的研究认为 BSM 能抑制烟草氧化胁迫，最终抑制打顶后烟碱含量上升。

烟草受到刺激诱导烟碱合成过程非常复杂，而且许多方面还没研究清楚，并存在许多争议，通过控制某路径的一种或几种酶来实现降低烟碱的目的不太现实，但大量研究表明各种调节路径几乎都与

ROS 存在联系。因此，烟草打顶后控制 ROS 的水平有可能削弱创伤信号，并最终达到降低烟碱的目的。AsA 作为一种非酶类抗氧化剂，能够有效淬灭活性氧自由基，并能与 APX 一同清除 H_2O_2。GSH 不仅能猝灭自由基，清除 H_2O_2，还能还原脱氢抗坏血酸(DHA)，使 ASA 能够循环利用，持续清除 ROS[28]。

本试验在烟草打顶后的伤口涂抹 AsA 和 GSH，用它们清除打顶后产生的大量 ROS，期待削弱创伤信号，并最终达到降低烟碱的目的，为我国烟叶烟碱含量普遍偏高的问题提供一种解决思路。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验于 2014 年 4—6 月于湖南农业大学烟草研究院楼顶进行。供试品种为‘云烟 87’。采用塑料袋花盆(下底直径 20 cm，上底直径 24 cm，高 24 cm，底部有细小穿孔用于漏水)装消毒后的河沙进行沙培。烟叶 7 叶期进行移栽，每天早晨 8:00 用霍格兰(Hoagland)营养液浇灌烟株。

1.2 试验试剂

L-抗坏血酸(AsA)，产品编号 A2174|CAS 号 50-81-7|sigma|plant cell culture tested; L-还原型谷胱甘肽(GSH)，产品编号 G6013|CAS 号 70-18-8|sigma|cell culture tested, BioReagent，≥98.0%, powder。

1%ASA 溶液参照金中华[29]的方法配置：溶解 0.1 g L-抗坏血酸于去离子水中，然后加入 EDTA 100 mg，冰乙酸 2 mL，去离子水定容至 100 mL，摇匀，置棕色试剂瓶中，贮于冰箱保存。

1%AsA+1%GSH 溶液亦参照金中华[29]的方法：溶解 0.1 g AsA 和 0.1 g GSH 于去离子水中，之后加入 EDTA 100 mg，冰乙酸 2 mL，去离子水定容至 100 mL 摇匀，置棕色试剂瓶中，贮于冰箱保存。

缓冲溶液的配置方法：在少量去离子水中加入 EDTA 100 mg，冰乙酸 2 mL，去离子水定容至 100 mL，摇匀置棕色试剂瓶中，贮于冰箱保存。

1.3 试验处理

试验设打顶涂抹 1%AsA(T1)、打顶涂抹 1%AsA+1%GSH(T2)、打顶后涂抹缓冲溶剂(TS1)、常规打顶(TS2)和不打顶(CK)5 个处理。试验于现蕾期打顶，并进行相应处理，T1、T2、TS1 打顶后立即用羊毛毫分别蘸取相应溶液 0.25 mL 涂抹于打顶后的伤口。每个处理 33 株烟，在处理后的 3 h、6 h、9 h、24 h、48 h 每个处理分别取 3 株全部鲜烟叶检测每株的 $\cdot O_2^-$、丙二醛和 H_2O_2 含量，其中 6 h 的样品鲜叶片和鲜根系外加检测茉莉酸含量；处理后的 3 h、6 h、9 h、24 h、48 h、96 h 每个处理取 3 株杀青，分别检测每株全部叶片和全部根系的烟碱。

1.4 检测方法

超氧阴离子($\cdot O_2^-$)含量测定参照王爱国等[30]的方法。过氧化氢(H_2O_2)含量的测定采取 Ferguson 等[31]丙酮抽提法和刘俊等[32]的萃取脱色法。过氧化氢含量测定参照张倩等[33]的方法。

丙二醛(MDA)含量分析：参照文献[34]并稍作改进，将采取叶片去叶脉，取鲜重 0.5 g，置于预冷研钵中，加入 2 mL 0.05 $mol \cdot L^{-1}$ pH 7.8 的磷酸缓冲液和少量石英砂研磨、匀浆后，定容到 10 mL 刻度试管中。取 5 mL 于刻度试管中在 16 000 $r \cdot min^{-1}$ 下离心 15 min，上清液即为样品提取液，5 ℃下保存备用。取 5 mL 试管分别加入 1.5 mL 粗酶液，2.5 mL 0.5%硫代巴比妥酸的 5%三氯乙酸溶液，混匀物于沸水浴上加热 15 min，迅速冷却后，再离心。取上清液测定 532 nm 和 600 nm 波长下的吸光度值(A_{532} 和 A_{600})。MDA 的浓度(C)公式为：$C=[(A_{532}-A_{600})\times A\times V/a]/0.155\times W$，式中，$A$ 为反应液总量，V 为提取液总量，a 为反应液中的提取液数量，W 为植物样品重量。

茉莉酸的制取与检测采用 Baldwin 等[35]和 Segarra 等[36]方法。

烟碱检测采用金闻博等[37]的紫外分光光度法。

1.5 数据处理

变化速率计算：TS2 为常规打顶，其相对于对照 CK 的各指标的变化为打顶引起变化量，变化量与时间的比值为变化速率；T1、T2 为涂抹抗氧化剂处理，其相对于 TS2 的变化可以视为抗氧化剂导致的变化量，变化量与时间的比值可以看做变化速率。定义“TS2 变化速率”为 $\frac{A_{TS2}-A_{CK}}{t}$，定义“T1 变化速率”为 $\frac{A_{TS2}-A_{T1}}{t}$，定义“T2 变化速率为” $\frac{A_{TS2}-A_{T2}}{t}$；A_{TS2} 为 TS2 在打顶后相应指标对应时间的含量，A_{T1} 为 T1 在打顶后相应指标对应时间的含量，A_{T2} 为 T2 在打顶后相应指标对应时间的含量，t 为相应指标处理后的时间。

指标对打项响应的关联：定义各检测指标对打顶净响应强度为 S，定义超氧阴离子、过氧化氢、丙二醛 3 个检测指标的净响应强度的 $S=S_T-S_{CK}$，定义茉莉酸的净响应强度的 $S=T_{(6\ h)}-CK_{(6\ h)}$，烟碱的净响应强度的 $S=T_{(96\ h)}-CK_{(96\ h)}$。

$$S_T=\frac{T_{0h}+T_{3h}}{2}\times 3+\frac{T_{3h}+T_{6h}}{2}\times 3+\frac{T_{6h}+T_{9h}}{2}\times 3+\frac{T_{9h}+T_{24h}}{2}\times 15+\frac{T_{24h}+T_{48h}}{2}\times 24 \quad (1)$$

$$S_{CK}=\frac{CK_{0h}+CK_{3h}}{2}\times 3+\frac{CK_{3h}+CK_{6h}}{2}\times 3+\frac{CK_{6h}+CK_{9h}}{2}\times 3+\frac{CK_{9h}+CK_{24h}}{2}\times 15+\frac{CK_{24h}+CK_{48h}}{2}\times 24 \quad (2)$$

式中: S_T 为各处理 0~48 h 的加权值, $T_{(ih)}$为各处理相应指标对应时间的含量, S_{CK} 为 CK 0~48 h 的加权值, $CK_{(ih)}$为 CK 相应指标对应时间的含量。

对各指标对打项的响应强度进行相关性分析, 探讨打顶后各指标间变化的关联性。

采用 Microsoft Excel 2010、SPSS 20 进行数据分析。

2　结果与分析

2.1　打顶后 AsA 和 GSH 处理对烤烟烟碱含量的影响

对根系烟碱的分析(图 1A)表明, CK(不打顶)处理在 96 h 内烟碱含量稳定; 打顶措施能促使烟碱含量迅速上升, 除处理后 3 h 的 T2、处理 9 h 的 T1 和 T2, 其他处理(T1、T2、TS1、TS2)各处理后时间的烟碱含量都显著高于 CK。打顶后涂抹 AsA+GSH 或 AsA 能有效抑制烟碱含量上升, T1、T2 与 TS1、TS2 在处理后 3~24 h 差距较小, 处理后 48~96 h 逐渐拉开差距, 处理后 96 h T1、T2 的烟碱含量显著低于 TS1、TS2; 其中 T2 与 T1 在处理后 3~24 h 无显著差异, 处理后 48~96 h T2 显著低于 T1。说明打顶后涂抹 AsA+GSH 对抑制烟碱上升的效果要好于涂抹 AsA。

对叶片烟碱的分析(图 1B)表明, 各处理叶片烟碱上升趋势与根系烟碱上升趋势相似。CK 的烟碱含量在 48 h 内基本稳定, 打顶处理(T1、T2、TS1、TS2)的烟碱含量都出现了不同程度的升高。其中升高最快的是 TS1、TS2, 处理后 3~96 h 都显著高于 CK, 且高于 T1、T2, 这与根系烟碱变化不同; TS1 和 TS2 在处理后 3~96 h 无显著差异, 说明涂抹缓冲液不能对烟碱变化造成影响。T1、T2 的烟碱含量在处理后都显著高于 CK, 显著低于 TS1、TS2, 说明打顶后涂抹 AsA+GSH 或 AsA 能有效抑制烟碱含量上升; T2 在处理后 9 h、48 h、96 h 烟碱含量都显著低于 T1, 说明涂抹 AsA+GSH 对烟碱的抑制效果要好于涂抹 AsA。96 h 后 T1 的烟碱含量比 TS2 低 17.5%, T2 的烟碱含量比 TS2 低 21.5%。

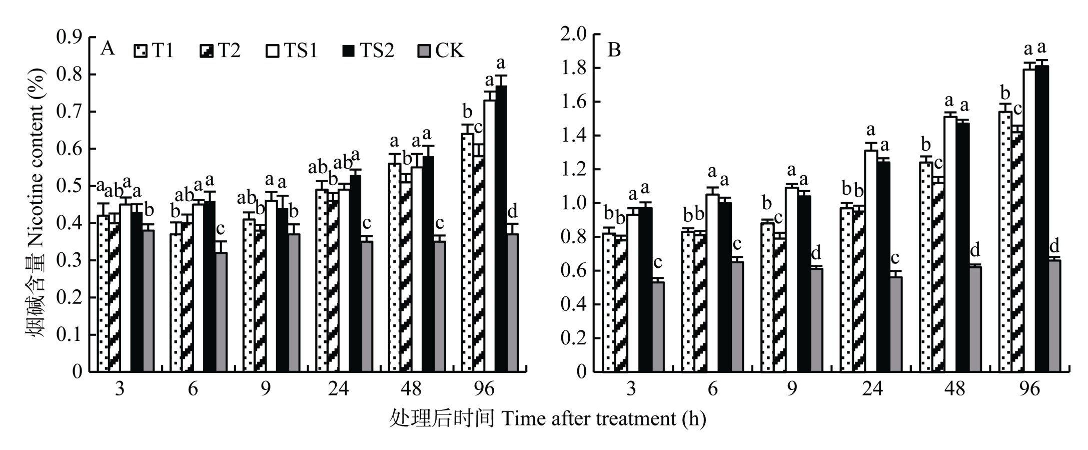


图 1　不同 AsA 和 GSH 处理下烤烟打顶后根系(A)和叶片(B)的烟碱含量

Fig. 1　Root (A) and leaf (B) nicotine contents of flue-cured tobacco with different AsA and GSH treatments after topping

T1: 打顶后涂抹 1%AsA; T2: 打顶后涂抹 1%AsA+1%GSH; TS1: 打顶后涂抹缓冲溶剂; TS2: 常规打顶; CK: 不打顶。不同小写字母表示相同处理时间不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同。T1: daubing 1% AsA after topping; T2: daubing 1% AsA + 1% GSH after topping; TS1: daubing buffer solvent after topping; TS2: conventional topping; CK: no topping. Different small letters mean significant difference at 0.05 level under different treatments in the same time after treatment. The same below.

2.2　打顶后 AsA 和 GSH 处理对烤烟超氧阴离子含量的影响

图 2A 结果表明, CK(不打顶)处理烤烟超氧阴离子含量在 48 h 内基本稳定。打顶能促使烟株产生成倍超氧阴离子, 处理后 3 h, TS2(常规打顶)超氧阴离子远高于 CK, 之后快速下降, 在处理后 24 h 已经和 CK 接近, 且无显著差异, 之后含量保持稳定且与 CK 无显著差异。TS1(涂抹缓冲液)在 48 h 内与 TS2 无显著差异。涂抹 AsA+GSH 或 AsA 的 T1、T2 对超氧阴离子上升有抑制作用, 处理后 3 h 超氧阴离子含量显著低于 TS1、TS2, 但显著高于 CK; 处理后 6 h 与 CK 接近且差异不显著, 显著低于 TS1、TS2, T2 超氧阴离子含量与 T1 无显著差异。

图 2B 结果表明, TS2 处理烤烟超氧阴离子含量变化速率在打顶后 3 h 较高, 之后快速下降, 24 h 时基本接近于 0; T1 与 T2 处理的降解速率处理 3 h 后较高, 之后迅速下降, 但两者又有区别: T1 的降解速率在处理 3 h 时高于 T2 的降解速率, 在处理 6 h

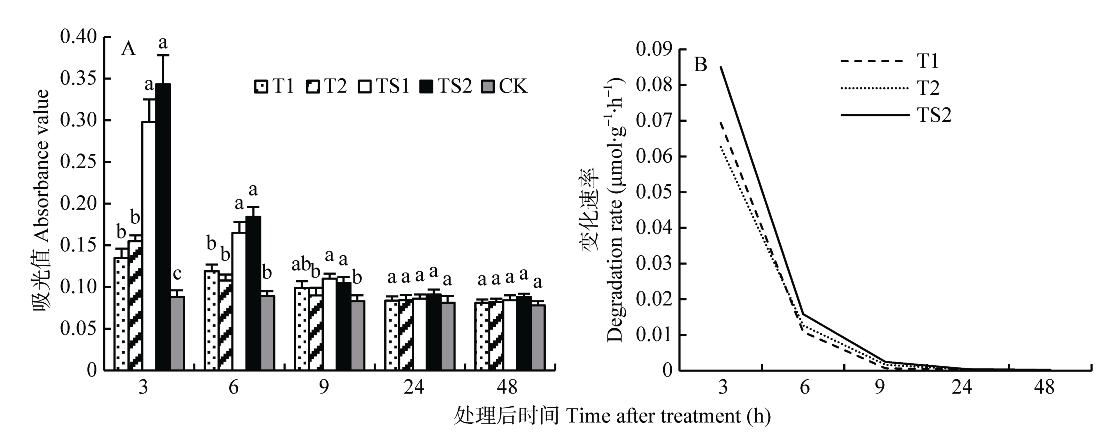


图 2　不同 AsA 和 GSH 处理下烤烟打顶后超氧阴离子含量(A)及其变化速率(B)

Fig. 2　Ultra oxygen anion content (A) and its change rate (B) of flue-cured tobacco with different AsA and GSH treatments after topping

时低于 T2 的降解速率，在处理 9 h 与 T2 的降解速率接近。说明处理后 3 h 涂抹 AsA 对超氧阴离子上升的抑制效果好于涂抹 AsA+GSH，在处理 6 h 涂抹 AsA+GSH 对超氧阴离子上升的抑制效果好于涂抹 AsA。之后两者同趋于 0，无差别。

2.3　打顶后 AsA 和 GSH 处理对烤烟 H_2O_2 含量的影响

图 3A 表明，CK 处理烤烟的过氧化氢含量在处理 48 h 内基本稳定，打顶措施能显著促使烟草过氧化氢含量的增长(T1、T2、TS1、TS2)。其中 TS2 处理(常规打顶)过氧化氢含量呈现先上升后下降的趋势，在处理 6 h 时达最大值，在 48 h 接近 CK，且与 CK 无显著差异。TS1 在处理 6 h、9 h、24 h 过氧化氢含量显著低于 TS2。涂抹 AsA+GSH 或 AsA 能有效抑制过氧化氢含量的上升，T1、T2 的过氧化氢含量在处理后 3 h、6 h 显著低于 TS1、TS2，显著高于 CK，处理后 9 h、24 h 显著低于 TS2，高于 CK，处理后 48 h 各个处理之间无显著差异；T2 在处理后 6 h 显著低于 T1，其他时间无显著差异。

图 3B 结果表明，TS2、T1、T2 处理 48 h 时接近于 0，TS2 变化速率 24 h 前明显高于 T1 和 T2，T1、T2 的降解速率同样缓慢下降，0~9 h T2 的变化速率都高于 T1 的变化速率。说明涂抹 AsA+GSH 对过氧化氢上升的抑制效果好于涂抹 AsA。

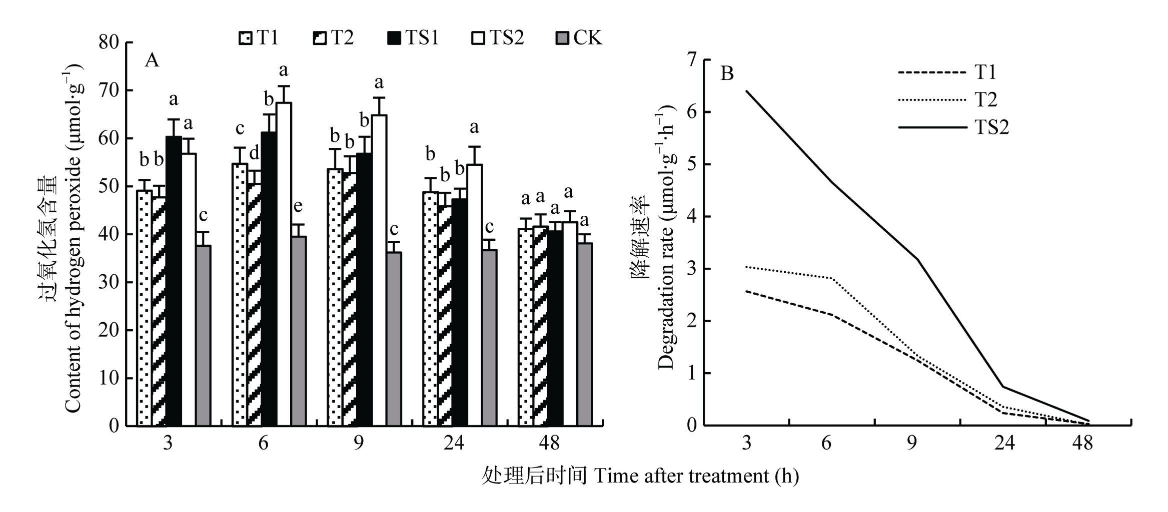


图 3　不同 AsA 和 GSH 处理下烤烟打顶后过氧化氢含量(A)及其降解速率(B)

Fig. 3　Hydrogen peroxide content (A) and its change rate (B) of flue-cured tobacco with different AsA and GSH treatments after topping

2.4　打顶后 AsA 和 GSH 处理烤烟丙二醛含量的影响

图 4A 表明，CK 处理烤烟在处理 48 h 内丙二醛含量几乎没有变化。打顶能诱导丙二醛成倍产生，其中 TS2 在处理后 3 h 含量最高，在 3~6 h 下降较快，随后呈缓慢下降，在 48 h 接近 CK，且与 CK 无显著差异。TS1 在处理后 3 h 显著低于 TS2，之后与 TS2 无显著差异。涂抹 AsA+GSH 或 AsA 对丙二醛含量上升也有明显抑制效果，T1、T2 在 0~48 h 内呈现先上升后下降趋势，除在处理后 6 h T1 与 TS1、TS2 无显著差异，处理后 3~24 h，T1、T2 丙二醛含量都

显著低于 TS1、TS2, 48 h 后与各处理间无显著差异；其中处理后 3 h、6 h 时 T2 显著低于 T1，其他时间无显著差异。

图 4B 中 TS2、T1、T2 的变化曲线类似于反比例函数，即开始快速下降，之后缓慢下降的规律。T2 的降解速率在 3~9 h 都高于 T1 的降解速率，之后几乎相同，说明涂抹 AsA+GSH 对丙二醛上升的抑制效果要好于涂抹 AsA。

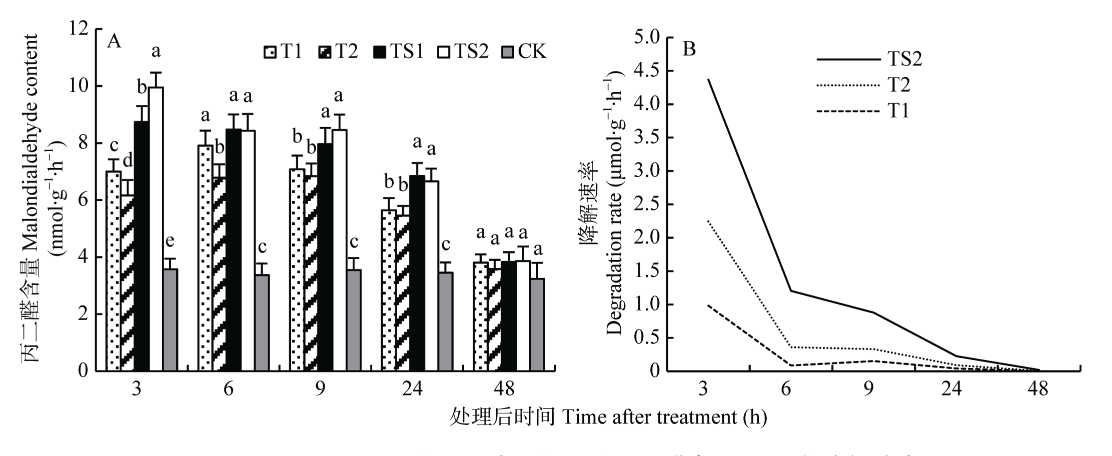


图 4　不同 AsA 和 GSH 处理下烤烟打顶后丙二醛含量(A)及其降解速率(B)

Fig. 4　Malondialdehyde content (A) and its change rate (B) of flue-cured tobacco with different AsA and GSH treatments after topping

2.5　打顶后 AsA 和 GSH 处理对烤烟茉莉酸含量的影响

根据 Vick 等[12]提出的茉莉酸十八烷酸途径，茉莉酸前体物来自叶绿体质膜氧化产物亚麻酸，那么亚麻酸必定与活性氧自由基有关，所以茉莉酸也应该会受活性氧自由基浓度影响。

对叶片(图 5A)和根系(图 5B)的茉莉酸检测结果表明，处理后 6 h 对照茉莉酸含量最低；打顶处理能促使茉莉酸含量明显增加，其中 TS2 含量成倍高于 CK，TS1 与 TS2 差异不显著，说明涂抹缓冲液对茉莉酸含量没有显著影响；T1、T2 却显著低于 TS1、TS2，说明涂抹 AsA+GSH 或 AsA 能有效抑制茉莉酸含量上升；T2 的茉莉酸含量显著低于 T1，说明涂抹 AsA+GSH 对烟碱的抑制效果要好于涂抹 AsA。

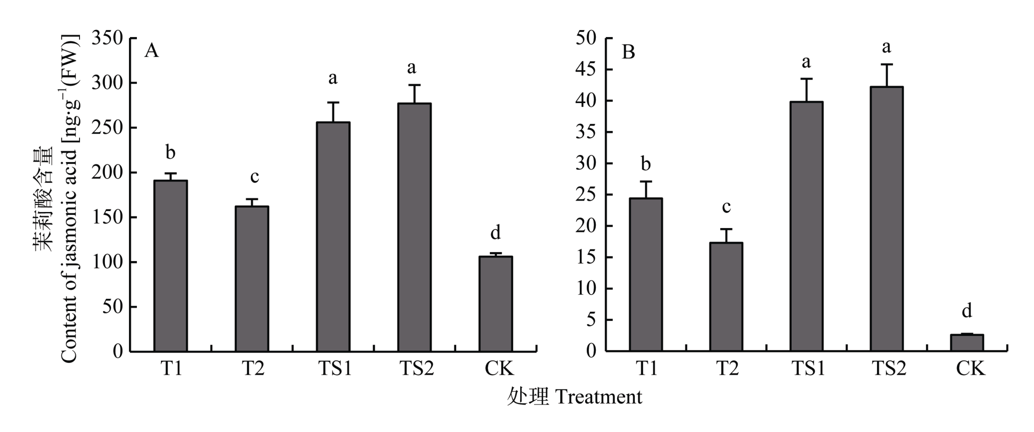


图 5　不同 AsA 和 GSH 处理下烤烟打顶 6 h 后叶片(A)及根系(B)茉莉酸含量

Fig. 5　Leaf (A) and root (B) jasmonic acid contents of flue-cured tobacco with different AsA and GSH treatments after topping for 6 hours

对根系茉莉酸的检测结果表明打顶促使茉莉酸上升的程度大于叶片，涂抹 AsA+GSH 或 AsA 对茉莉酸的抑制效果也大于叶片，各处理间的比较与叶片相同，可以参照叶片的变化规律。

2.6　打顶后 AsA 和 GSH 处理下烤烟各指标响应的关联性

对各检测指标一段时间内变化的加权，得到各检测指标对打顶措施的响应强度见表 1。由表 1 可以看出，T1 和 T2 各指标响应强度都明显低于 TS1 和 TS2，T2 响应强度弱于 T1，这些再次说明 AsA+GSH 能有效抑制表中各指标含量的上升，且 AsA+GSH 比 AsA 的抑制效果更强。

对各检测指标响应强度的相关性分析见表 2。由表 2 可知，打顶后各检测指标(超氧阴离子、过氧化

表 1 不同 AsA 和 GSH 处理下烤烟指标对打顶的响应强度

Table 1 Response intensities of indexes of tobacco under different AsA and GSH treatments to topping

处理 Treatment	超氧阴离子 Superoxide anion	过氧化氢 Hydrogen peroxide	丙二醛 Malondialdehyde	叶片茉莉酸 Leaf jasmonic acid	根系茉莉酸 Root jasmonic acid	根系烟碱 Root nicotine	叶片烟碱 Leaf nicotine
T1	0.46	513.45	105.87	85.00	21.80	0.27	0.88
T2	0.43	446.10	90.87	56.00	14.70	0.21	0.76
TS1	1.27	655.30	143.80	150.00	37.20	0.36	1.13
TS2	1.36	851.80	148.46	171.00	39.60	0.40	1.15
CK	0	0	0	0	0	0	0

表 2 不同 AsA 和 GSH 处理下烤烟各指标对打顶响应强度之间相关性分析

Table 2 Correlation analysis between response intensity to topping of each detected indexes

	超氧阴离子 Superoxide anion	过氧化氢 Hydrogen peroxide	丙二醛 Malondialdehyde	叶片茉莉酸 Leaf jasmonic acid	根系茉莉酸 Root jasmonic acid	根系烟碱 Root nicotine	叶片烟碱 Leaf nicotine
超氧阴离子 Superoxide anion	1.000						
过氧化氢 Hydrogen peroxide	0.918*	1.000					
丙二醛 Malondialdehyde	0.910*	0.980**	1.000				
叶片茉莉酸 Leaf jasmonic acid	0.984**	0.960**	0.950*	1.000			
根系茉莉酸 Root jasmonic acid	0.978**	0.961**	0.965**	0.998**	1.000		
根系烟碱 Root nicotine	0.928*	0.990**	0.995**	0.970**	0.979**	1.000	
叶片烟碱 Leaf nicotine	0.883*	0.973**	0.998**	0.929*	0.947*	0.989**	1.000

*表示显著相关, **表示极显著相关。* means significant correlation at 0.05 level, ** means significant correlation at 0.01 level.

氢、丙二醛、叶片茉莉酸、根系茉莉酸、根系烟碱、叶片烟碱)两两显著正相关，有些甚至还出现了极显著正相关，进一步说明打顶后它们的变化不是各自孤立，而是相互联系、相互影响的。

3 讨论

打顶这一项破坏性的生产措施的确引起烟草内部化学成分的变化。根据检测结果，正常打顶后烟草叶片的超氧阴离子大幅增加，但在 24 h 内大幅下降，说明烟草在遭受到破坏后具有自身恢复的能力，打破的氧化还原平衡能够在一段时间后再平衡。打顶后涂抹缓冲溶液初始超氧阴离子含量比常规打顶稍低，可能是由于缓冲溶液能暂时隔离空气中的氧，减缓氧化迸发；涂抹 AsA 能有效降低超氧阴离子浓度；涂抹 AsA+GSH 与涂抹 AsA 差异不显著，处理后 3 h 超氧阴离子降解速率快于涂抹 AsA+GSH，6 h 则相反，可能是由于谷胱甘肽–抗坏血酸循环机制，AsA+GSH 之前抗氧化能力稍弱，之后 GSH 能够还原氧化态 AsA，使其能循环利用。另外，各个处理超氧负离子浓度前期差异比较大，但在 24 h 后都回到一个几乎相同的水平，可以推断烟草打顶后氧化还原平衡大约需要 24 h 左右。

打顶引起了烟草体内过氧化氢含量的变化，除不打顶处理过氧化氢几乎趋于平稳外，其他几个处理几乎都是先增加后降低的趋势，说明过氧化氢相对于超氧负离子稳定性较高，在产生的过程中有浓度积累的现象，可能是作为一种稳定的活性氧起到传递信号的作用，这与 Gechev 等[10]、Foyer 等[22]的研究结果一致。分析结果表明，涂抹抗氧化剂 AsA 和 GSH 能有效抑制过氧化氢含量的上升，涂抹 AsA+GSH 的抑制效果强于涂抹 AsA，这与超氧负离子趋势有区别，该结果可以用谷胱甘肽–抗坏血酸循环来解释[28]。

丙二醛浓度是反映质膜氧化程度的指标。本试验中，丙二醛变化趋势几乎和过氧化氢一致，同样可以用丙二醛化学性状稳定来解释，可以得知涂抹 AsA+GSH 和涂抹 AsA 的处理能有效保护细胞膜系统，削弱活性氧自由基对质膜的破坏，且涂抹 AsA+GSH 的处理效果强于涂抹 AsA 处理。

以上 3 个指标可以代表活性氧，分析结果表明打顶处理能有效促使活性氧自由基含量升高，打破氧化还原平衡。与张新华等[26]、李影等[27]的研究区别在于，他们的研究是使用寡食性昆虫的下唇腺分泌的特异性酶(BSM)抑制活性氧自由基，抑制机理尚不清晰；本试验通过 AsA 与 GSH 猝灭活性氧自由基达到了同样的效果，机理清晰。

活性氧自由基可以引起多种复杂的信号传递，我们对其中最具有代表性的茉莉酸检测结果发现，打顶处理引起了叶片和根系茉莉酸含量的上升，涂抹 AsA+GSH 和涂抹 AsA 的处理茉莉酸含量明显低于常规打顶处理，说明涂抹 AsA+GSH 和涂抹 AsA 能有效抑制茉莉酸含量的上升，也可以推断 AsA-GSH 是通过抑制活性氧自由基来抑制茉莉酸含量的上升，根据 Vick 等[12]的研究结果，后一种可能性可信度更高。本试验的茉莉酸研究结果支持程新胜等[23,25]的一系列研究成果。

茉莉酸作为一种植物激素可以诱导植物产生抗性反应，烟碱作为烟草的一种次生代谢产物可以参与烟草的抗性防御[13]。试验中，涂抹抗氧化剂能有效抑制根系和叶片烟碱含量的增加，且涂抹 AsA+GSH 的抑制效果强于涂抹 AsA，这与茉莉酸的变化趋势一致，原因可能是由于烟碱的变化是由茉莉酸刺激引起的，且在含量上与茉莉酸含量成正比。陈新胜等[23,25]也是在寻求降低茉莉酸的方法来抑制烟碱，本试验烟碱降低效果与陈新胜等的 BSM 降烟碱效果类似。

打顶和涂抹抗氧化剂都对活性氧自由基、茉莉酸、烟碱含量产生了影响，但是它们又不是相互独立，而是密切相关的。对活性氧自由基、茉莉酸、烟碱 7 个检测指标的相关性分析结果表明，各检测指标间相关性显著，有些还达到了极显著水平，这些证明它们是相互联系，相互影响的。

本试验涂抹抗氧化剂能有效抑制烟草打顶后超氧阴离子、过氧化氢、丙二醛、茉莉酸和烟碱含量的上升，且 AsA+GSH 的抗氧化效果要好于涂抹 AsA。

4 结论

抗氧化型物质(AsA-GSH)涂抹烟草打顶后的伤口能有效降低活性氧、茉莉酸、烟碱的含量，且活性氧、茉莉酸、烟碱之间存在着密切联系。AsA+GSH 比 AsA 有更强的抗氧化性，并且能更好地抑制打顶后烟碱的上升。

BSM 通过酶的作用间接抑制氧化胁迫，而 AsA 与 GSH 通过直接淬灭活性氧自由基直接抑制氧化胁迫，从而最终抑制打顶后茉莉酸含量的上升。使用 AsA 与 GSH 代替 BSM 能起到降低成本，提高效率的作用，具有更广泛的推广价值，为我国烤烟烟碱含量偏高的问题提供了一种解决思路。

参考文献 References

[1] Doke N, Miura Y. *In vitro* activation of NADPH-dependent O_2-generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1995, 46(1): 17–28

[2] 王广山，陈卫华，薛超群，等．烟碱形成的相关因素分析及降低烟碱技术措施[J]．烟草科技，2001(2): 38–42
Wang G S, Chen W H, Xue C Q, et al. Discussion on factors of influencing nicotine level and measures for reducing nicotine level[J]. Tobacco Science & Technology, 2001(2): 38–42

[3] Lyytikäinen-Saarenmaa P. The responses of scots pine, *Pinus sylvestris*, to natural and artificial defoliation stress[J]. Ecological Applications, 1999, 9(2): 469–474

[4] Greenberg J T, Guo A, Klessig D F, et al. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions[J]. Cell, 1994, 77(4): 551–563

[5] Papadakis A K, Roubelakis-Angelakis K A. The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts[J]. Plant Physiology, 1999, 121(1): 197–206

[6] Fath A, Bethke P, Beligni V, et al. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(372): 1273–1282

[7] Apostol I, Heinstein P F, Low P S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction[J]. Plant Physiology, 1989, 90(1): 109–116

[8] 陈花，吴俊林，李晓军．叶绿体中活性氧的产生和清除机制[J]．现代生物学进展，2008, 8(10): 1979–1981
Chen H, Wu J L, Li X J. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(10): 1979–1981

[9] 吴顺，肖浪涛．植物体内活性氧代谢及其信号传导[J]．湖南农业大学学报：自然科学版，2003, 29(5): 450–456
Wu S, Xiao L T. Metabolism and signaling conduction of the reactive oxygen species in plant[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2003, 29(5): 450–456

[10] Gechev T, Gadjev I, Van Breusegem F, et al. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59(4): 708–714

[11] Trippi V S, Gidrol X, Pradet A. Effects of oxidative stress caused by oxygen and hydrogen peroxide on energy metabolism and senescence in oat leaves[J]. Plant & Cell Physiology, 1989, 30(2): 157–162

[12] Vick B A, Zimmerman D C. Biosynthesis of jasmonic Acid by several plant species[J]. Plant Physiology, 1984, 75(2): 458–461

[13] Shoji T, Yamada Y, Hashimoto T. Jasmonate induction of putrescine *N*-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*[J]. Plant & Cell Physiology, 2000, 41(7): 831–839

[14] Dat J F, Foyer C H, Scott I M. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard

seedlings[J]. Plant Physiology, 1998, 118(4): 1455–1461
[15] Dat J F, Lopez-Delgado H, Foyer CH, et al. Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings[J]. Plant Physiology, 1998, 116(4): 1351–1357
[16] Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D. H_2O_2 and NO: Redox signals in disease resistance[J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(9): 330–334
[17] Ievinsh G, Tillberg E. Stress-induced ethylene biosynthesis in pine needles: A search for the putative 1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid-independent pathway[J]. Journal of Plant Physiology, 1995, 145(3): 308–314
[18] Schraudner M, Moeder W, Wiese C, et al. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco BelW3[J]. The Plant Journal, 1998, 16(2): 235–245
[19] Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, et al. Ozone-sensitive arabidopsis rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death[J]. The Plant Cell, 2000, 12(10): 1849–1862
[20] Dixon R A, Harrison M J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants[J]. Advances in Genetics, 1990, 28: 165–234
[21] Watanabe T, Seo S, Sakai S. Wound-induced expression of a gene for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and ethylene production are regulated by both reactive oxygen species and jasmonic acid in *Cucurbita maxima*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39(2): 121–127
[22] Foyer C H, Noctor G. Tansley review No. 112. oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling[J]. New Phytologist, 2000, 146(3): 359–388
[23] 程新胜, 沈嘉, 曹流俭. 分子信号调节物对烟草上部叶烟碱及其他化学成分影响研究初报[J]. 热带作物学报, 2008, 29(3): 333–337
Cheng X S, Shen J, Cao L J. Effects of wounding signal regulations on the nicotine and other chemical composition in tobacco upper leaves[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2008, 29(3): 333–337
[24] 宗娜, 王琛柱. 三种夜蛾科昆虫对烟草烟碱的诱导及其与昆虫下唇腺葡萄糖氧化酶的关系[J]. 科学通报, 2004, 49(14): 1380–1385
Zong N, Wang C Z. Induction of nicotine in tobacco by herbivory and its relation to glucose oxidase activity in the labial gland of three noctuid caterpillars[J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 49(14): 1380–1385
[25] 黄兰, 王正刚, 舒俊生, 等. 仿生型信号分子对烟草主要生物碱的抑制作用[J]. 中国烟草学报, 2010, 16(2): 1–5
Huang L, Wang Z G, Shu J S, et al. Inhibitory effects of bionics signal molecule on principal alkaloids in tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2010, 16(2): 1–5
[26] 张新华, 姚忠达, 陈常伟, 等. 打顶及仿生信号分子对烟草氧化胁迫的影响[J]. 烟草科技, 2011(12): 61–64
Zhang X H, Yao Z D, Chen C W, et al. Reaction of tobacco to oxidation stress induced by topping and bionic signal molecules[J]. Tobacco Science and Technology, 2011(12): 61–64
[27] 李影, 王程辉, 周初跃, 等. 打顶及仿生信号分子对不同烤烟品种氧化胁迫的影响[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(6): 20–23
Li Y, Wang C H, Zhou C Y, et al. Effects of topping and bionics signal molecule on oxidation stress of different flue-cured tobacco varieties[J]. Chinese Tobacco Science, 2013, 34(6): 20–23
[28] Potters G, Horemans N, Bellone S, et al. Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism[J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1479–1487
[29] 金中华. 抗坏血酸溶液配制方法的改进[J]. 环境监测管理与技术, 2001, 13(6): 39–40
in Z H. Improvement about ascorbic acid solution make-up method[J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2001, 13(6): 39–40
[30] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990(6): 55–57
Wang A G, Luo G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants[J]. Plant Physiology Communications, 1990(6): 55–57
[31] Ferguson I B, Watkins C B, Harman J E. Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons: Effect on ethylene and hydroperoxide production[J]. Plant Physiology, 1983, 71(1): 182–186
[32] 刘俊, 吕波, 徐朗莱. 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 548–551
Liu J, Lü B, Xu L L. An improved method for the determination of hydrogen peroxide in leaves[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2000, 27(5): 548–551
[33] 张倩, 付时雨, 李海龙, 等. 一种快速测定过氧化氢浓度的方法[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(3): 767–770
Zhang Q, Fu S Y, Li H L, et al. A rapid method for the determination of hydrogen peroxide concentration[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(3): 767–770
[34] 张宪政, 陈凤玉, 王荣富. 植物生理学实验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994: 164–165
Zhang X Z, Chen F Y, Wang R F. Plant Physiology Experiment Technology[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1994: 164–165
[35] Baldwin I T, Zhang Z P, Diab N, et al. Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*[J]. Planta, 1997, 201(4): 397–404
[36] Segarra G, Jáuregui O, Casanvoa E, et al. Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress[J]. Phytochemistry, 2006, 67(4): 395–401
[37] 金闻博, 戴亚, 杨俊. 烟草化学分析与烟气分析[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1993: 123–125
Jin B W, Dai Y, Yang J. Tobacco Chemical Analysis and Flue Gas Analysis[M]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Press, 1993: 123–125